

A caracterização e correção da deficiência de ferro em plantas de morangueiro: novas abordagens

Maribela Pestana¹, Florinda Gama¹, Teresa Saavedra¹, João Castro Pinto², Anunciación Abadía³, Amarilis de Varennes⁴ & Pedro José Correia¹

¹ICAAM, Universidade do Algarve, FCT, Ed. 8, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, fpestana@ualg.pt, pcorreia@ualg.pt

²ADP-Fertilizantes SA, Estrada Nacional nº10. Apartado 88, 2616-907 Alverca do Ribatejo, castropinto@adp-fertilizantes.pt

³Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 50080 Zaragoza, Espanha, mabadia@eead.csic.es

⁴CEER, Universidade Técnica de Lisboa, ISA, Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa, adevarennes@isa.utl.pt

Resumo

O ferro (Fe) é um elemento abundante nos solos e apesar de ser necessário em pequenas quantidades para as plantas, a incidência de clorose férrica (deficiência de Fe) é comum em muitas espécies agrícolas sendo necessário recorrer à aplicação massiva ao solo de quelatos de Fe sintéticos.

Neste trabalho apresentam-se de forma resumida os resultados obtidos em diversos ensaios com plantas de morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cujos objetivos foram: o estudo dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de controlo da deficiência de ferro e a avaliação de novas alternativas para a correção da clorose férrica.

Em todos os ensaios, conduzidos em sistema hidropónico, os sintomas foram induzidos pela ausência do Fe na solução e os resultados comparados com um tratamento controlo com Fe. O grau de clorose e a recuperação dos sintomas foram estimados através dos valores de SPAD. A atividade da quelato de Fe(III)-redutase (QF-R), enzima responsável pela redução do Fe nas raízes, foi determinada nos ápices radiculares pela quantificação colorimétrica do complexo Fe(II)-BPDS. O teor de Fe foi determinado por espectrofotometria de absorção atómica, após calcinação das amostras a 450 °C e digestão ácida das cinzas.

As plantas de morangueiro que cresceram sempre sem Fe apresentaram sintomas de clorose férrica e alterações da morfologia externa das raízes, acompanhadas por incrementos na atividade radicular da QF-R. A recuperação de plantas cloróticas foi efetuada através da aplicação do mesmo produto (sulfato ferroso) em dois locais distintos, foliarmente e à solução. Nas plantas recuperadas pela aplicação de Fe à solução, a atividade da QF-R manteve-se alta, sugerindo uma estratégia destinada a incrementar as reservas deste elemento. Em alternativa aos quelatos férricos sintéticos foi testada a aplicação foliar de um extrato vegetal preparado a partir de aparas de relva (patente PT/103584-2009 da UALG e patente internacional PCT/PT2007/000041-2008; em propriedade entre a UALG e a empresa ADP-Fertilizantes) que foi eficaz no reverdescimento após três aplicações. Neste contexto, os resultados são discutidos de forma a salientar as implicações práticas destas respostas fisiológicas e bioquímicas, numa perspetiva global da fertilização do Fe.

Palavras-chave: clorose férrica, SPAD, quelato de ferro redutase.

Abstract

Characterization and correction of Fe deficiency in strawberry: novel approaches.

Iron (Fe) is abundant in soils and although it is required in small amounts by plants the incidence of iron chlorosis (Fe deficiency) is very common in a number of crops and requires massive soil application of Fe-chelates to correct it. In this work, we present the most important results obtained in several experiments conducted with strawberry to study the physiological and biochemical response mechanisms to Fe deficiency, and the assessment of novel alternatives to control this nutritional disorder.

In all experiments, conducted in hydroponic systems, symptoms were induced by withdrawing Fe from the solution and the results were compared to a control treatment grown with Fe. The degree of chlorosis and symptoms recovery was estimated using SPAD values. The activity of iron chelate reductase, the enzyme responsible for Fe reduction in roots, was determined in root apices by colorimetric quantification of the BPDS complex. The Fe concentration in leaves and roots was quantified by atomic absorption spectrophotometry after treatments at 450 °C and acid digestion of the ashes obtained.

Strawberry plants that grew always without Fe, presented Fe chlorosis and morphological external root modifications associated with increases of the activity of the Fe-reductase enzyme. The recovery of chlorotic plants was achieved by application of Fe sulphate either to leaves or to the nutrient solution. In plants recovered by using Fe in the solution, the enzyme maintained a large activity, suggesting a strategy to increase plant Fe pools.

As an alternative to synthetic Fe chelates, we also tested a foliar application of a plant extract obtained from fresh grass clippings (national patent PT/103584-2009 of UALG, and international patent PCT/PT2007/000041-2008, UALG and ADP-Fertilizantes), which was effective in chlorosis recovery after three applications. The results are discussed in order to highlight the practical implications of these responses under a perspective of optimization of crop Fe fertilization.

Keywords: iron chlorosis, SPAD, ferric chelate reductase.

Introdução

O processo de absorção do Fe nas dicotiledóneas (Abadía et al., 2011; Pestana et al., 2004), inicia-se pela sua redução na membrana plasmática, através da ação de um quelato de Fe(III)-redutase. Uma vez no simplasto do sistema radicular, o Fe(II) é oxidado e complexado pelo ácido cítrico a Fe(III)-citrato, forma em que é translocado, *via* xilema, para a parte aérea. O Fe²⁺ que entra no citoplasma é complexado pela nicotianamina e nesta forma é uniformemente distribuído no simplasma, permitindo a sua participação nos diversos processos metabólicos.

Numa situação de deficiência de Fe, as plantas desenvolvem sintomas de clorose férrica, que devido à baixa mobilidade do Fe na planta, surgem nas folhas mais jovens, caracterizando-se pelo aparecimento de um fino reticulado no qual apenas as nervuras permanecem verdes (Abadía, 1992). As diferentes espécies vegetais e por vezes algumas cultivares apresentam comportamentos distintos face à clorose férrica o que permite classificá-las, em espécies eficientes, pela sua capacidade de adaptação à deficiência de Fe e espécies não eficientes, que por terem mecanismos de resposta efetivos, morfológicos ou fisiológicos, desenvolvem os sintomas característicos de clorose férrica. Adicionalmente, esta deficiência nutritiva afeta vários processos

metabólicos e origina decréscimos na produção e na qualidade dos frutos (Alvarez-Fernández et al., 2006; Pestana et al., 2003; 2010).

Atualmente, a correção da clorose férrica em fruteiras faz-se sobretudo recorrendo a aplicações massivas ao solo de quelatos férricos sintéticos, como o ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro (Fe-EDDHA). Devido à rápida imobilização do Fe em solos calcários, estas aplicações têm de ser repetidas nas mesmas árvores, quase sempre anualmente, estimando-se que os custos da correção da clorose férrica representem 60% dos custos totais da fertilização (Tagliavini et al., 2000). Na Região de Zaragoza, estima-se que sejam gastos cerca de 14 M€ para corrigir a clorose férrica nos 90.000 ha de fruteiras instaladas em solos calcários (Abadía et al., 2004).

O impacto ambiental destas aplicações pode ser elevado, já que os agentes quelatantes sintéticos são bastante estáveis e podem poluir os solos, rios e lençóis freáticos (Lucena, 2006). Por esta razão, realizaram-se diversos estudos que procuram tratamentos alternativos, sem recurso a quelatos sintéticos. Na UALG, recorreu-se ao resíduo proveniente da manutenção de espaços verdes, aparas de relva, e preparou-se um extrato vegetal, que aplicado foliarmente, foi eficaz no reverdescimento de plantas de morangueiro com clorose férrica (patente PT/103584-2009 da UALG e patente internacional PCT/PT2007/000041-2008; em compropriedade entre a UALG e a empresa ADP-Fertilizantes).

Neste trabalho apresentam-se de forma resumida os resultados obtidos em diversos ensaios com plantas de morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cujos objetivos foram: o estudo dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos de controlo da deficiência de Fe e a avaliação de novas alternativas para a correção da clorose férrica.

Material e Métodos

Para atingir os objetivos propostos usaram-se plantas de morangueiro (*Fragaria* × *ananassa* Duch) da cultivar ‘Selva’ adquiridas em viveiro de raiz nua e transplantadas para caixas de 20 litros com solução de Hoagland, correspondendo às seguintes concentrações (em mM): 2,5 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2,5 KNO_3 , 0,5 KH_2PO_4 , 1,0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e, (em μM) 23 H_3BO_3 , 0,4 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4,5 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 1 MoO_3 . Estabeleceram-se duas modalidades com base na adição de 10 μM Fe (Fe10), na forma de quelato Fe-EDDHMA ou pela ausência do Fe (Fe0), induzindo o aparecimento dos sintomas. O arejamento das soluções foi assegurado por uma conduta de tubagens ligadas a um compressor. O pH e a condutividade elétrica (CE) foram usados para monitorizar as soluções nutritivas que foram substituídas sempre que os valores iniciais de CE decresceram 0,2 dS m^{-1} .

O estudo da recuperação de morangueiros cloróticos foi efetuado pelo estabelecimento de dois ensaios. Num dos ensaios (ensaio 1), a recuperação foi avaliada através da adição de sulfato ferroso de dois modos: à solução nutritiva (+Fe-solução) ou por pulverização foliar (+Fe-folhas). A aplicação do Fe à solução nutritiva foi efetuada com uma solução de sulfato ferroso (0,75 mM de Fe) enquanto a pulverização foliar foi realizada três vezes com uma solução de sulfato ferroso (1,8 mM) conforme descrito em Pestana et al. (2012). No outro ensaio (ensaio 2), as plantas cloróticas foram pulverizadas com um extrato vegetal (+Fe-extrato) preparado a partir de aparas de relva (Pestana et al., 2008; 2009; 2011).

O grau de clorose e de recuperação dos sintomas foram estimados através dos valores de SPAD medidos nas folhas jovens e convertidos em clorofila total (CHL) através da curva de calibração $\text{CHL} = 0,45 \times \text{SPAD}^2 - 1,11 \times \text{SPAD} + 32,56$ (Pestana et al., 2011).

A atividade da quelato de Fe(III)-redutase (QF-R), enzima responsável pela redução do Fe nas raízes, foi determinada nos ápices radiculares pela quantificação colorimétrica do complexo Fe(II)-BPDS (Pestana et al. 2012).

A partição da biomassa foi avaliada através da razão entre os pesos secos da raiz e da parte aérea, determinados após 48 h a 70 °C, no final dos ensaios. De seguida, o material vegetal foi moído e calcinado, tendo o teor de Fe sido determinado por espectrofotometria de absorção atômica, após calcinação das amostras a 450 °C e digestão ácida das cinzas (Pestana et al., 2001).

As plantas foram sempre aleatoriamente distribuídas pelas modalidades. A comparação das médias obtidas para determinado parâmetro foi efetuada através da análise de variância (ANOVA) para um nível de significância de 95%. A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa SPSS 17.0.

Resultados e Discussão

As plantas de morangueiro que cresceram sempre sem Fe apresentaram sintomas de clorose férrica e decréscimos elevados no teor de clorofila (quadro 1), tal como seria de esperar (Abadía & Abadía, 1992). Simultaneamente foram registadas alterações na morfologia externa das raízes, acompanhadas por incrementos na atividade radicular da QF-R (quadro 2).

A recuperação das plantas cloróticas foi efetuada através da aplicação de sulfato de ferro(II) em dois locais distintos, foliarmente e à solução, e o reverdecimento foi observado e traduzido por incrementos nos teores de clorofila total das folhas jovens (quadro 1). Por sua vez, observou-se que a atividade radicular da QF-R respondeu mais rapidamente ao Fe aplicado foliarmente do que ao Fe adicionado às raízes (quadro 2). Nas plantas recuperadas pela aplicação de Fe à solução, a atividade da QF-R manteve-se alta, sugerindo uma possível estratégia destinada a incrementar as reservas deste elemento na planta (Pestana et al., 2012). Os teores de Fe nas folhas aumentaram com a aplicação de Fe foliarmente, o mesmo se observando quando este foi aplicado à solução nutritiva apesar da concentração atingida ser mais baixa (quadro 2). No entanto, a razão da biomassa parte aérea/raiz com aplicação de Fe à solução tornou-se idêntica à da obtida nas plantas que foram sempre cultivadas com Fe (quadro 2).

Como alternativa aos quelatos férricos sintéticos, a aplicação foliar do extrato vegetal foi eficaz após três aplicações, tendo-se observado valores de clorofila equivalentes aos das plantas que cresceram sempre com Fe na solução (quadro 1) embora o teor de Fe na planta não tenha aumentado sugerindo um uso mais eficiente do Fe já presente na planta (quadro 2). Parece haver um certo desfasamento entre as alterações morfológicas e as variações na atividade da QF-R induzidas pela deficiência, pois após o reverdecimento das folhas motivado pela aplicação foliar do extrato vegetal, as alterações morfológicas observadas a nível radicular (típicas da estratégia I) foram desativadas mas o mesmo não aconteceu com a atividade da QF-R, que permaneceu alta. Assim, as alterações morfológicas da raiz parecem ser só reguladas pelo teor foliar de Fe, enquanto as respostas fisiológicas como a atividade da QF-R necessita de sinais vindos da raiz e da parte aérea em simultâneo (Pestana et al., 2011).

Neste contexto, numa perspetiva global da fertilização do ferro, é importante avaliar as diferenças entre as respostas fisiológicas e bioquímicas à aplicação foliar e/ou ao solo de forma a otimizar a produção.

Conclusões

A aplicação foliar de um extrato vegetal preparado a partir de aparas de relva pode ser uma alternativa aos quelatos férricos sintéticos na correção da clorose férrica em morangueiros. Através dos resultados obtidos constatou-se que é possível otimizar a época de aplicação do Fe, minimizando as perdas e desenvolver novos métodos que permitam dinamizar as reservas nativas de Fe na planta.

Agradecimentos

Agradecemos ao Eng. Jorge Matos do Campo Vila Sol por amavelmente nos ceder as aparas usadas nestes ensaios. Este trabalho foi financiado pelo projeto nacional PTDC/AGR-ALI/66065/2006, pela Caixa de Crédito Agrícola Mútuo do Algarve (Prémio 2008), pelo projeto espanhol (MICINN; projeto AGL2009 - 09018, cofinanciado pelo FEDER) e o Governo de Aragão (grupo A03).

Referências

- Abadía, J. 1992. Leaf response to Fe deficiency: A review, *Journal of Plant Nutrition*, 15:1699-1713.
- Abadía, J., Álvarez-Fernández, A., Rombolà, A. D., Sanz, M., Tagliavini, M., & Abadía, A. 2004. Technologies for the diagnosis and remediation of Fe deficiency. *Soil Science and Plant Nutrition* 50:965-971.
- Abadía, J., Vázquez, S., Rellán-Álvarez, R., El-Jendoubi, H., Abadía, A., Álvarez-Fernández, A. & López-Millán, A.F. 2011. Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. *Plant Physiology & Biochemistry*, 49:471-482.
- Lucena J. 2006. Synthetic iron chelates to correct iron deficiency in plants. In L.L. Barton e J. Abadía. *Iron nutrition in plants and rizospheric microorganisms. Developments in plant and soil sciences*, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 437-448.
- Pestana, M., David, M., de Varennes, A., Abadía, J. & Faria, E.A. 2001. Responses of 'Newhall' orange trees to iron deficiency in hydroponics: effects on leaf chlorophyll, photosynthetic efficiency and root ferric chelate reductase activity. *Journal of Plant Nutrition* 24 (10):1609-1620.
- Pestana, M., de Varennes A. & Faria, E.A. 2003. Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees: a review. *Food, Agriculture & Environment*, 1:46-51.
- Pestana, M., de Varennes A. & Faria E.A. 2004. Lime-induced iron chlorosis in fruit trees. In: R. Dris e S. M. Jain. *Production practices and quality assessment of food crops. Volume 2: Plant mineral nutrition and pesticide management*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 171-215.
- Pestana, M., Domingos, I. & Correia, P.J. 2008. Use as a fertilizer of a plant extract obtained from golf courses and lawn maintenance. Patente Internacional PCT/PT2007/000041 da Universidade do Algarve em compropriedade com a CUF - Adubos de Portugal SA, publicada a 18 de abril; WO 2008/044955, 18p.
- Pestana, M., Domingos I. & Correia P.J. 2009. Uso de um extrato vegetal como fertilizante, obtido a partir dos resíduos provenientes das atividades de manutenção dos relvados. Patente nacional registada nº PT/103584 da Universidade do Algarve.
- Pestana, M., de Varennes, A., Miguel, M.G. & Correia, P.J. 2010. Consequences of iron deficiency on fruit quality in citrus and strawberry. In: C. Nunes (ed.), *Environmentally Friendly and Safe Technologies for Quality of Fruits and Vegetables.*, 92-96, Faro, Portugal, Universidade do Algarve.

- Pestana, M., Correia, P.J., Saavedra, T., Gama, F., Abadía, A. & Varennes A. 2012. Development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 53: 1-5.
- Pestana, M., Gama, F., Saavedra, T., de Varennes, A. & Correia, P.J. 2012. The root ferric-chelate reductase of *Ceratonia siliqua* (L.) and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. respond differently to levels of iron. *Scientia Horticulturae* 135: 65-67.
- Tagliavini, M., Abadía, J., Rombolà, A. D., Abadía, A., Tsipouridis, C. & Marangoni, B. 2000. Agronomic means for the control of iron chlorosis in deciduous fruit trees. *Journal of Plant Nutrition* 23 (11-12):2007-2022.

Quadro 1- Valores médios de clorofila das folhas jovens registados ao longo do tempo em dois ensaios (Pestana et al., 2011; 2012) de recuperação da clorose férrica em morangueiros cv ‘Selva’. A % de variação foi calculada em relação ao controlo (plantas verdes). Para cada ensaio e cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

Número de dias	(+15) Primeiras folhas	(+36) Plantas com clorose Fe	(+55) Início da recuperação	(+71) Final do ensaio	% de variação
<i>Ensaio 1</i>					
Fe0	414 a	139 b	118 b	94 c	
Fe10	423 a	318 a	408 a	397 a	
+Fe-folhas				204 b	+ 54 %
+Fe-solução				331 a	+ 82 %
<i>Ensaio 2</i>					
Fe0	344 b	148 b	64 b	32 b	
Fe10	545 a	600 a	527 a	470 a	
+Fe-extrato		98 b	81 b	449 a	+ 95%

Quadro 2- Valores médios de atividade da QF-R, de concentração de Fe nas folhas e na raiz e da razão raiz/parte aérea, em peso seco, registados no final dos dois ensaios (Pestana et al., 2011; 2012) de recuperação da clorose férrica em morangueiros ‘Selva’. Para cada ensaio e cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes a 95% (teste de Duncan).

	QF-R	Fe (mg kg ⁻¹ ps)		Raiz/parte aérea
	(nmol Fe(II) g ⁻¹ pf min ⁻¹)	Folhas	Raízes	(peso seco)
<i>Ensaio 1</i>				
Fe0	52 a	59 d	374 c	0.9 a
Fe10	10 c	84 c	593 b	0.4 b
+Fe-folhas	5 d	275 a	395 c	0.7 a
+Fe-solução	25 b	173 b	1658 a	0.5 b
<i>Ensaio 2</i>				
Fe0	28.3 a	37 a	1205 a	1.2 a
Fe10	24.9 a	51 a	1003 a	0.7 b
+Fe-extrato	18.6 a	72 a	683 a	0.8 a

pf – peso fresco; ps- peso seco